

⑪ 公表特許公報 (A)

昭63-503007

⑫ 公表 昭和63年(1988)11月2日

⑬ Int. Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	審査請求 未請求	予備審査請求 未請求	部門 (区分) 6 (1)
G 01 N 33/58		A-8305-2G			
C 07 H 21/04					
C 12 Q 1/68		6807-4B			
		6807-4B			
G 01 N 33/50		P-8305-2G			

(全 8 頁)

⑭ 発明の名称 DNAプローブおよびその調製方法

⑮ 特 願 昭62-500537

⑯ 翻訳文提出日 昭62(1987)8月27日

⑰ 出 願 昭61(1986)12月26日

⑱ 国際出願 PCT/JP86/00662

⑲ 国際公開番号 WO87/04165

⑳ 国際公開日 昭62(1987)7月16日

㉑ 発 明 者 村 尾 康 雄

神奈川県鎌倉市津西1-31-17

㉒ 発 明 者 保 坂 俊 太 郎

東京都三鷹市深大寺3865

㉓ 発 明 者 三 浦 久 美 子

神奈川県藤沢市大鋸3-5-18

㉔ 出 願 人 東 レ 株 式 会 社

東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号

㉕ 代 理 人 弁 理 士 谷 川 英 次 郎

㉖ 指 定 国 AT(広域特許), BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), FR(広域特許), GB(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域特許)

請 求 の 範 囲

1. 検出しようとするDNA又はRNAに相補的な単鎖DNA断片と、非放射性マーカー又は非放射性マーカーを結合することができる官能基を有する二重鎖DNA断片とを含むDNAプローブ。
2. 検出しようとするDNA又はRNAに相補的な単鎖DNA断片以外の領域が変質的に全て二重鎖であることを特徴とする請求の範囲第1項記載のDNAプローブ。
3. 検出しようとするDNA又はRNAに相補的な単鎖DNA断片以外の領域がバクテリオファージ由来であることを特徴とする請求の範囲第1項又は第2項記載のDNAプローブ。
4. バクテリオファージはM13であることを特徴とする請求の範囲第3項記載のDNAプローブ。
5. 検出しようとするDNA又はRNAに相補的な単鎖DNA断片を含む第1の単鎖DNAを提供する工程と、第1の単鎖DNAの、検出しようとするDNA又はRNAに相補的なDNA断片以外の部分に相補的な領域を有し、非放射性マーカー又は非放射性マーカーを結合することができる官能基を有する第2の単鎖DNAを第1の単鎖DNAとハイブリダイズさせる工程とを含むDNAプローブの調製方法。
6. 第1の単鎖DNAの、検出しようとするDNA又はRNAに相補的なDNA断片以外の領域はバクテリオファージ由来であることを特徴とする請求の範囲第5項

記載の方法。

7. バクテリオファージはM13であることを特徴とする請求の範囲第5項記載の方法。
8. 第2の単鎖DNAは非放射性マーカーを結合することができる官能基を有し、ハイブリダイゼーション後に非放射性マーカーを該官能基に結合する工程をさらに含むことを特徴とする請求の範囲第5項ないし第7項のいずれか1項に記載の方法。
9. 検出しようとするDNA又はRNAに相補的な単鎖DNA断片を含む第1の単鎖DNAを提供する工程と、第1の単鎖DNAの、検出しようとするDNA又はRNAに相補的な単鎖DNA断片以外の領域上に、該領域を鋳型として用い、非放射性マーカー又は非放射性マーカーを結合することができる官能基を有するヌクレオチドを用いて相補DNAを形成する工程とを含むDNAプローブの調製方法。
10. 第1の単鎖DNAの、検出しようとするDNA又はRNAに相補的なDNA断片以外の領域はバクテリオファージ由来であることを特徴とする請求の範囲第9項記載の方法。
11. バクテリオファージはM13であることを特徴とする請求の範囲第10項記載の方法。
12. 第2の単鎖DNAは非放射性マーカーを結合することができる官能基を有し、相補DNA形成後に非放射性マーカーを該官能基に結合する工程をさらに含むこと

を特徴とする請求の範囲第9項ないし第11項のいずれか1項に記載の方法。

野村 幸雄  
DNAプローブ及びその調製方法

技術分野

この発明は、ウイルス、微生物又は動植物等に由来するDNA又はRNAを検出し又は定量するために用いられるDNAプローブに関する。

背景技術

DNA又はRNAの塩基配列は、そのDNA又はRNAを含むウイルス又は生物にとって固有のものである。DNAやRNAはそれに相補的なDNA又はRNAとハイブリダイズして二重鎖を形成する。最近、この性質を利用してDNAやRNAを検出又は定量するためにDNAプローブが用いられている。

従来、DNAプローブは、検出しようとするウイルス、微生物又は動植物のDNA又はRNAに相補的なDNA又はRNAをラベルで直接標識することによって調製されている。最も高感度の標識は放射線標識である。しかしながら、放射線標識は感度が高いほど半減期が短く、取扱いが危険であり、特殊な高感度設備が必要であるという欠点を有する。従って、非放射線性マーカーでプローブを標識することが望まれる。

最近、ビオチン-アビジン結合を用いた酵素ラベルが用いられている。アビジンは卵白中に含まれる分子量68000の塩基性タンパク質であり、分子量244のビオチンと高い親和性を有しており、その親和定数は $10^{11}$

M<sup>-1</sup>という高さである。酵素による標識は、検出しようとするDNA又はRNAに相補的なDNAプローブを、これとのハイブリダイゼーションをその低分子量の故にあまり妨害しないビオチンで標識し、DNAプローブを検出しようとするDNA又はRNAとハイブリダイズさせた後にアビジン-酵素結合体をアビジン-ビオチン結合を利用して結合させることによって行なわれる。

DNAをビオチンで標識するための公知の方法は、デオキシリボヌクレアーゼ及びDNAポリメラーゼの存在下でDNAを構成するヌクレオチドをビオチン結合ヌクレオチドに置換するニックトランスレーション法及びフォトビオチン(BRESA社製)を光照射下にDNAと反応させる方法を包含する。

抗原抗体反応もまたDNAプローブを標識するために用いられる。この方法では、DNAを先ずビオチン、フルオレセイン又はN-アセトキシ-2-アセチルアミノフルオレン等のハプテンで標識し、検出しようとするDNA又はRNAとハイブリダイズさせた後、酵素又は蛍光物質で標識した、DNAプローブに結合されたハプテンに対して特異的な抗体をDNAプローブ上のハプテンと結合させて検出しようとするDNA又はRNAを検出する。

化学的に合成されたものを除き、従来のDNAプローブのほとんどは二重鎖である。従って、DNAプローブを検出しようとするDNA又はRNAとハイブリ

ダイズする際に、アルカリ処理又は熱処理によってDNAプローブを一本鎖に変性させなければならない。さらに、検出しようとするDNA又はRNAに相補的なDNA自身が標識されるので、相補性が低下し、その結果ハイブリダイゼーションが妨げられて検出感度が低下する。特に、DNAプローブが酵素のような高分子量物質によって直接標識される場合には、ハイブリダイゼーションが著しく妨害される。

さらに、検出しようとするDNA又はRNAとは異なる起源のDNA又はRNAがしばしば被検試料中に混入する。ベクターを用いて製造されたDNAがDNAプローブとして用いられる場合には、ベクター由来のDNA領域は通常十分には除去されていない。従って、被検試料にベクターと同一起源のDNA又はRNAが混入していると、その混入DNA又はRNAが偽陽性として検出される。

発明の開示

従って、この発明の目的は、検出感度が高く、取扱いが安全であり、簡便に使用することができるDNAプローブを提供することである。

この発明のこの目的及び他の目的は、検出しようとするDNA又はRNAに対して相補的な単鎖DNA断片と、非放射線性マーカー又は非放射線性マーカーを結合することができる官能基を有する二重鎖DNA断片を含むDNAプローブを提供することによって達成される。

この発明によると、検出しようとするDNA又はRNAとのハイブリダイゼーションに関与しない二重鎖領域が標識されているので、検出しようとするDNA又はRNAに相補的なDNA断片は元の状態にあり、ハイブリダイゼーションが標識によって全く妨害されず、従って検出感度が高い。さらに、検出しようとするDNA又はRNAとのハイブリダイゼーションに供されるDNA断片以外の領域は二重鎖でありいずれのDNA又はRNAともハイブリダイズしないので、DNAプローブの二重鎖領域と同一起源のDNA又はRNAが被検試料中に混入していても、その混入物はDNAプローブとハイブリダイズしないので偽陽性がもたらされない。この発明のDNAプローブの、検出しようとするDNA又はRNAに相補的な領域は単鎖であるので、使用前にプローブを変性させる必要がなく、従って簡便に使用できる。この発明のDNAプローブは放射性標識を利用しないので、プローブの取扱いが安全であり特殊な設備を必要としない。この発明のDNAプローブが、非放射性マーカーを結合することができる官能基を有する場合には、DNAプローブは酵素で直接標識することができる。これは単に便利だけでなく、それぞれ異なるマーカーで標識されたこの発明のDNAプローブの混合物を用いることによって未知のDNA又はRNAを同定することも可能になる。

#### 図面の簡単な説明

図、ボツリヌス菌、ブルセラ菌、赤痢菌、腸炎ビブリオ菌、バクテリウム、大腸菌、カンピロバクターのような細菌；カンジダのような酵母；プラスモディウム；樹皮トレボネマのようなスピロヘータ；並びに腫瘍細胞及びガン細胞のような動物細胞を包含する。検出しようとするDNA又はRNAは全塩基配列を有していてもよいしその一部であってもよく、また単鎖でも二重鎖でもよい。

DNA又はRNAに相補的なDNA断片は通常、検出しようとするDNA又はRNAと同一の起源に由来する。もっとも、供給源ウイルス、細菌、微生物又は動物細胞から抽出したもの；供給源からのDNA又はRNAをベクターに挿入し、このベクターを宿主中で複製する遺伝子工学によって産生されたもの；及びDNA又はRNAの塩基配列が知られている場合には化学的に合成されたものを包含するあらゆるDNA又はRNAを用いることができる。

この発明のDNAプローブに用いることができる非放射性マーカーは蛍光物質、化学発光物質及び酵素を包含し、さらに、ビオチン及びN-アセトキシ-2-アセチルアミノフルオレンのような低分子物質を結合することができる物質、これらの低分子物質をハプテンとする抗体、上記低分子物質を結合することができるアビジンのような高分子物質並びにマーカーと上記物質の複合体をも包含する。蛍光物質の非限定的な例としてフルオリ

第1図はこの発明のDNAプローブの製造方法を説明するための模式図。

第2図はこの発明のDNAプローブの他の製造方法を説明するための模式図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

上述したように、この発明のDNAプローブは、検出しようとするDNA又はRNAに相補的な単鎖部分を有する。この発明のDNAプローブによって検出しようとするDNA又はRNAの起源は、例えば、肝炎(A型、B型)ウイルス、AIDSウイルス(BLV-III)、ATLウイルス(HTLV-1)、単純ヘルペス(I型、2型)、サイトメガロウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ポリオウイルス、コクサッキーウイルス、エコーウイルス、インフルエンザウイルス、狂犬病ウイルス、黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルス、マールブルグ病ウイルス、アデノウイルス、デングウイルス、EBウイルス、マンズウイルス、ワクシニアウイルス、バルボウイルス、パポウイルス、ロタウイルス、タナポックスウイルス、ヤバウイルス、ラッサ熱ウイルス、タバコモザイクウイルスのようなウイルス；マイコプラズマ；ツツガムシリケッチア、Q熱リケッチア、発疹チフスリケッチアのようなリケッチア；クラミジアトラコーマティス、クラミジアブシタコシス；リン菌、破傷風菌、黄色ブドウ球菌、レンサ球菌、結核菌、麻痺菌、炭疽菌、肺炎球菌、サルモネラ菌、コレラ菌、チフス菌、パラチフス

ゼイン及びローダミンを挙げることができる。化学発光物質の非限定的な例としてルミノール、イソルミノール、N-(4-アミノブチル)-N-エチルイソルミノール、N-(8-アミノヘキシル)-N-エチルイソルミノール、N-(4-アミノブチル)-N-エチルイソルミノールヘミスクシミアミド、ロフィン、ルシゲニン、アクリロニウムエステル、ピロガロール、ルシフェリン、インドール、リボフラビン、2-メチル-6-フェニル-7,7-ジヒドロイミダゾ(1,2-a)-ピラジン-3-オン及びその誘導体を挙げることができる。酵素の非限定的な例としてペルオキシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ及びアシッドフォスファターゼを挙げることができる。

DNAを高分子マーカーで直接標識することもできるが、DNAをビオチンのような低分子マーカーで標識し、次いで酵素又は発光物質のようなマーカーが結合された、上記低分子物質に特異的に結合する高分子物質を結合させることもできる。また、DNAをハプテンで標識し、次いでそのハプテンに対して特異的な抗体と酵素との複合体又は抗体を蛍光標識したものを結合させることができる。

非放射標識を結合することができる官能基は公知であり、非限定的な例としてアミノ基、カルボキシル基、メルカプト基、水酸基、エポキシ基及びホルミル基を挙げることができる。DNAがこのような基を有する場合

には、それを酵素で直接標識することができる。このような基をDNAに導入する方法は例えば欧州特許第63,879号又は“Nucleic Acid Research” 9(8), p.1933(1981)に記載されている。なお、この発明のDNAプローブがこのような官能基を有する場合には、非放射性マーカはこのような官能基に結合されるべきである。非放射性標識の官能基への結合は検出しようとするDNA又はRNAとのハイブリダイゼーションの前又は後に行なうことができる。

この発明のDNAプローブの二重鎖領域は、非放射性マーカで標識することができ、又は非放射性マーカを結合することができる官能基を有し、かつ検出しようとするDNA又はRNAに相補的な単鎖DNAを連結することができるいずれのDNAであってもよく、例えばベクターDNA又は合成DNAである。これらのうち、φX-174、S13、M12、f1、fd及びM13のような、単鎖環状DNAを有するバクテリオファージに由来するものが好ましい。

この発明のDNAプローブの大きさは重要ではなく、12塩基ないし数十kbと広範囲にわたる。

この発明のDNAプローブは2つの基本的方法により調製することができる。第1の方法では、検出しようとするDNA又はRNAに相補的な断片を含む第1の単鎖DNAを、該第1の単鎖DNA中の検出しようとするDNA又はRNAに相補的な断片以外の領域に対して

相補的な部分を含む第2の単鎖DNAとハイブリダイズさせる。第2の単鎖DNAは非放射性マーカ又は非放射性マーカを結合することができる官能基を有する。第2の方法では、検出しようとするDNA又はRNAに対して相補的な単鎖DNA断片を含む第1の単鎖DNAを提供し、次いでこの第1の単鎖DNAを鈍型として用い、非放射性マーカ又は非放射性マーカを結合することができる官能基を有するヌクレオチドを用いて、検出しようとするDNA又はRNAに対して相補的な単鎖DNA断片以外の前記第1の単鎖DNAの領域上に相補DNA鎖(以下第2のDNAという)を形成する。これら2つの方法において、非放射性マーカを結合することができる官能基が用いられる場合には、非放射性マーカは二重鎖DNAが形成された後に結合することができる。

上記2つの方法を、添付の図面を参照しながらその好ましい具体例に基づいて詳細に説明する。

バクテリオファージ(以下ファージという)を用いた第1の方法の好ましい具体例を第1図に基づいて説明する。

ファージ、すなわち、その宿主が細菌又は放線菌であるウイルスは古くから知られている。ファージのうち、φX-174、S13、M12、f1、fd及びM13は単鎖環状DNAを有するものとして知られている。このようなファージのDNAが宿主細胞内に取り込まれる

と複製型と呼ばれる二重鎖環状DNAが先ず形成され、次いでこの二重鎖環状DNAを鈍型として用いて単鎖環状DNAが形成され、このようにして形成された単鎖環状DNAが次にファージの形態で細胞から放出される。第1の方法の好ましい具体例ではこのようなファージが用いられる。先ず、ファージが感染している宿主細胞からファージの二重鎖環状DNAを採取し、これを制限酵素で切断して調製する。上記制限酵素と同じ制限酵素で切断された、検出しようとするDNA又はRNAに対して相補的な二重鎖DNAを上記調製されたDNAと置換えて、検出しようとするDNA又はRNAに相補的なDNA断片が挿入された二重鎖環状DNA(第1図中、参照番号10で示す)を形成する。次にこのようにして得られた二重鎖DNAを宿主細胞にトランスフェクションさせる。二重鎖環状DNAは宿主細胞中で複製され、検出しようとするDNA又はRNAに対して相補的なDNA断片を含む第1の単鎖環状DNA12がファージの形態で宿主細胞から放出される。

一方、同じファージから誘導された二重鎖DNA(DNAは制限酵素、超音波処理又はニックトランスレーション等により断片化されている)を非放射性マーカ18でラベルし、次いでこれを変性して、前記第1の単鎖DNAの、検出しようとするDNA又はRNAに相補的なDNA断片以外の領域に相補的な第2の単鎖DNA18を形成する。この発明のDNAプロー

ブは前記第1の単鎖DNA12と第2の単鎖DNA18とをハイブリダイズすることによって得ることができる。

なお、非放射性マーカを結合することができる官能基は二重鎖DNA14又は単鎖DNA18に導入することができ、非放射性マーカを官能基に結合することができる。

この発明のDNAプローブを調製するための上述した第2の方法においては、第2のDNAを、検出しようとするDNA又はRNAに相補的なDNA断片以外の第1の単鎖DNA領域上に、第1の単鎖DNAの上記領域を鈍型として用いて形成する。これは、好ましくは10ないし20塩基、さらに好ましくは15ないし17塩基の合成DNA(プライマー)を、第1の単鎖DNAの二重鎖DNAにしようとする領域の3'末端部分とハイブリダイズさせ、ピオチン、ハプテン、蛍光物質、化学発光物質のような非放射性マーカを結合することができるdUTP及びdATPのようなヌクレオチド並びに4種類のヌクレオチド、すなわち、dATP、dCTP、dGTP及びdTTPの存在下でDNAポリメラーゼのクレノーフラグメントを用いて上記プライマーを伸長することによって行なうことができる。第2のDNAが完全に形成されたか否かは、別に調製した標準DNAを対照として用いた電気泳動によって確認することができる。第2のDNAの形成が1つのプライマーを用いて完了することができない場合に

は2又は3以上のプライマーを第1の単鎖DNAとハイブリダイズさせることができる。

第2の方法の好ましい具体例を第2図に基づいて説明する。検出しようとするDNA又はRNAに相補的な断片を含む第1の単鎖DNAは、例えば第1の方法と同様にすることができる。合成DNA24を適当な制限部位(第2図ではEcoRI部位)にハイブリダイズさせ、少なくとも1つの合成DNA22をプライマーとして第1の単鎖DNAの対応する部分にハイブリダイズさせる。言うまでもなく、プライマーをハイブリダイズさせる第1の単鎖DNAの部分は、検出しようとするDNA又はRNAに相補的な断片以外の領域である。次にDNAを上記制限酵素で切断する。DNAプローブが環状で用いられる場合には、第2の鎖の伸長を終結させるストッパーを、合成DNAに代えて制限部位に置かなければならない。次に、アミノ基の導入のためにアリルアミンが結合されたdUTP並びにdATP、dGTP、dCTP及びdTTPの存在下でDNAポリメラーゼを用いてプライマー22を伸長する。このようにして形成された第2のDNAにピオチンを結合するためにカプロイルアミドピオチン-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルをDNAと反応させると直鎖状のこの発明のDNAプローブを得ることができる。

この発明のDNAプローブは、環状又は直鎖状の形態で用いることができる。この発明のDNAプローブは

Aを調製した。

## 2. ピオチン標識M13mp19 RF DNAの調製

米国メリーランド州20877 ガイザーズバーグのBRL社から市販されているニクトロランスレーション試薬の溶液A4(各0.2 mMのdATP、dGTP及びdCTP) 5  $\mu$ l、2  $\mu$ lのM13mp19 RF DNA溶液(0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l、日本東京都府の宝酒造株式会社から市販)、2.5  $\mu$ lの0.4 mMピオチン-11-dUTP及び35.5  $\mu$ lの溶液E(H<sub>2</sub>O)を混合した。次いで5  $\mu$ lの溶液C(0.4 U/ $\mu$ lのBRL DNAポリメラーゼ、40 pg/ $\mu$ lのデオキシリボヌクレアーゼ)を混合物に加え、この混合物を15°Cで1.5時間インキュベートした。この反応混合物に5  $\mu$ lの溶液D(300 mM EDTA)及び1.25  $\mu$ lの5% SDS水溶液を加えた。この混合物を5 mlのセファデックスG-50カラムに架け、1 x SSC(0.15 M NaCl、15 mM クエン酸ナトリウム、pH7.0)で溶離し、検出液を150  $\mu$ lずつ分取した。各分をニトロセルロースろ紙上に2  $\mu$ lずつスポットし、80°Cで30分間加熱した。ろ紙をブロッキング緩衝液(2% BSA、0.05% Triton X-100、及び5 mMのEDTAを含むPBS(0.13 M NaCl、7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>))中に室温で30分間浸漬した。次にろ紙を、希釈緩衝液で200倍に希釈された、エンゾ社(ニューヨーク州ニューヨーク、ハドソンストリート325)から市販されているアビジンとアジッドフォスファターゼとの結合体である検出複合体「Iete X-1-acc」の溶液中に室温で1時間浸漬した。

従来のDNAプローブと同様に用いることができる。すなわち、調べようとするウイルス又は微生物を含むことが疑われる組織、体液等の被検試料又は動物細胞若しくはガン細胞の被検試料をガラス板に固定する。あるいは、組織、体液又は細胞から抽出されたDNA又はRNAをニトロセルロース又はナイロンのろ紙膜上に固定する。次いでガラス板又はろ紙膜を、予め単鎖に変性させた、検出しようとするDNA又はRNAと共にインキュベートする。DNAプローブが非放射性マーカーを結合することができる官能基を有し、非放射性マーカーを含まない場合には、非放射性マーカーをハイブリダイゼーション後に官能基に結合してハイブリダイズしたプローブを検出する。それぞれの段階において洗浄工程が通常行なわれる。

この発明は以下の実施例を参照することによってより良く理解されるであろう。実施例は例示のためにのみ示されたものであって、これらをいかなる場合も限定的に解釈してはならない。

## 実施例1

1. アデノウイルス2(Ad2) DNAが導入されたM13mp19 単鎖DNAの調製

1984年1月1日にアマシャム・ジャパンによって発行された「M13ファージによるクローニングとジデオキシシークエンス法」に記載された方法に従い、5.3 kbのAd2 DNAのHindIII断片が導入された単鎖M13mp19 DN

ろ紙を次に洗淨緩衝液(0.5 M NaCl、0.5% Triton X-100、1 mM EDTA、2% BSA及び10 mM KPO<sub>4</sub>、pH5.5)で5分間づつ5回洗い、予備検出緩衝液(0.2 M酢酸ナトリウム、pH5.8)で2分間づつ2回洗った。ろ紙を次に、1 mMのナフトールAS-MX フォスフェートの予備検出緩衝液と4  $\mu$ g/mlのファーストバイオレットB塩の予備検出緩衝液の100:1混合物である溶液中で室温で15時間インキュベートした。着色した面分を1つにまとめ、約1  $\mu$ g/mlのピオチン標識M13mp19 RF DNAを得た。

3. DNAプローブ溶液(ハイブリダイゼーション溶液)の調製

Ad2 DNAが挿入された300 ng/mlのM13mp19、5分間煮沸することによって変性した、300 ng/mlのピオチン標識M13mp19 RF DNA、50%ホルムアミド、4 x SSPE(0.72 M NaCl、40 mM NaPO<sub>4</sub>、4 mM EDTA、pH7.4)、5 x デンハルトの溶液(0.1% ポリビニルピロリドン360、0.1%フィコール400、0.1% BSA)、0.1% SDS、0.1 mg/ml 変性サケ精子DNA及び10% 硫酸デキストランを42°Cで16時間インキュベートした。

4. Ad2 DNAの検出及び定量

濃度が1000 ng/ml、100 ng/ml、10 ng/ml、1 ng/ml又は0.1 ng/mlのAd2 DNA(BRL社から購入)溶液各5  $\mu$ lをニトロセルロースろ紙上にスポットし、ろ紙を80°Cで1時間加熱した。ろ紙を生理食塩水中で10分間煮沸し急速に冷却し、予備ハイブリダイゼーション溶

液(50%ホルムアミド、4 x SSPE、5 x デンハルトの溶液、0.1% SDS及び0.1 µg/mlの変性サケ精子DNA)中に浸漬し、42°Cで3時間インキュベートした。ろ紙を次に、先に調製したハイブリダイゼーション溶液中で42°Cで19時間インキュベートし、0.1% SDSを含む2 x SSCで室温で15分間洗い、同じ溶液で60°Cで15分間、2回洗い、SDSを含まない2 x SSCで室温で1回洗い、予備検出緩衝液中に浸漬した。ろ紙上のスポットはビオチン標識M13mp19 RF DNAの調製の場合と同様に着色され、10 ng/ml以上のA42 DNAが検出された。

#### 実施例2

##### 1. A42 DNAが挿入されたM13mp19 単鎖DNAの調製

A42 DNAが挿入されたM13mp19 単鎖DNAを実施例1と同様にして調製した。

##### 2. ビオチン標識M13mp19 RF DNAの調製

BRESA社(5001, サウスオーストラリア、アデライド)により市販されているフォトビオチン溶液(1µg/ml)2 µl、及び10 µlのPBSをヘマトクリット管に注入した。管の両端を封止した後、管を氷水中に入れキセノンランプで照射した。反応混合物を5 mlのセファデックスG-50カラムに架け、0.1% SDSを含む1 x SSC溶液で溶離した。溶離した液は150 µlずつ分取した。各部分について実施例1と同様にして比色試験を行ない、着色した画分を1つにまとめて約1 µg/mlのビオチン標識M13mp19 RF DNAの溶液を得た。

キュベートした。100 µlの緩衝液(67 mM KPO<sub>4</sub>、及び6.7 mM MgCl<sub>2</sub>、pH7.4)、アリルアミン-dUTP(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 78, No. 11, pp. 5633-5637, 1981年11月の記載に従って調製)の1 mM水溶液18 µl並びに3 µlのDNAポリメラーゼIラージフラグメント(4.2単位/µl)を混合物に加え、これを25°Cで30分間インキュベートした。フェノール抽出後、適正に二本鎖化されたDNAがエタノール沈殿によって得られた。

##### 2) ビオチンによる標識

1) で得られたDNAを100 µlの0.1 M NaHCO<sub>3</sub>に溶解し、これに20 µlのε-カプロイルアミドビオチン-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(BRL社から市販)のDMSO溶液(1µg/ml)を加え、この混合物を室温で10分間反応させた。反応混合物を3 mlのセファデックスG-50カラムに架け、1 x SSC(0.15 M 塩化ナトリウム及び0.015 M クエン酸ナトリウム)で溶離し、DNAを含む画分を回収した。

##### 3. HBV DNAの検出及び定量

500 ng/mlのビオチン標識DNAプローブを含むハイブリダイゼーション溶液を実施例1と同様にして調製した。HBV DNAがその上でクローニングされているpBR322ベクターを制限酵素Sph Iで開環し、濃度1000 ng/ml、100 ng/ml、10 ng/ml及び1 ng/mlの上記溶液を5 µlずつニトロセルロースろ紙上にスポットした。

##### 3. DNAプローブ溶液(ハイブリダイゼーション溶液)の調製

ビオチン標識M13mp19 RF DNAを超音波破砕機(海上電機4280)で1 Aで30秒間処理した以外は実施例1と同様にしてDNAプローブ溶液を調製した。

##### 4. A42 DNAの検出及び定量

検出及び定量を実施例1と同様にして行ない、10 ng/ml以上の濃度のスポットを検出した。

#### 実施例3

##### 1. B型肝炎ウイルス(HBV)DNAが挿入されたM13mp19 単鎖DNA(HB/M13)の調製

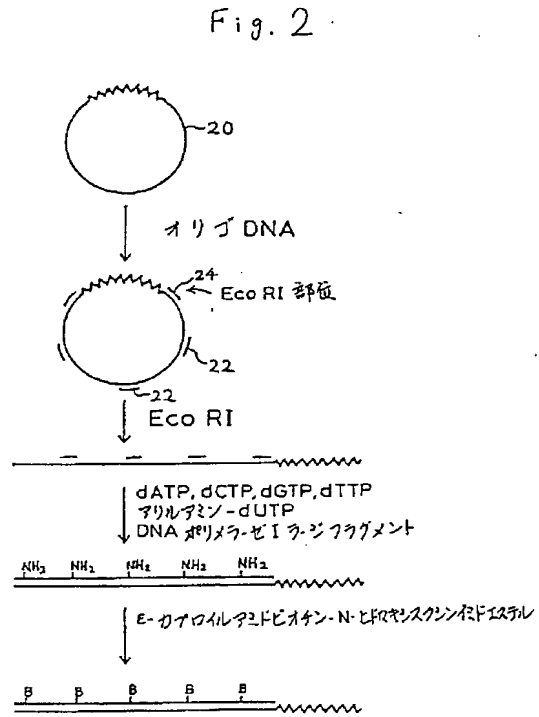
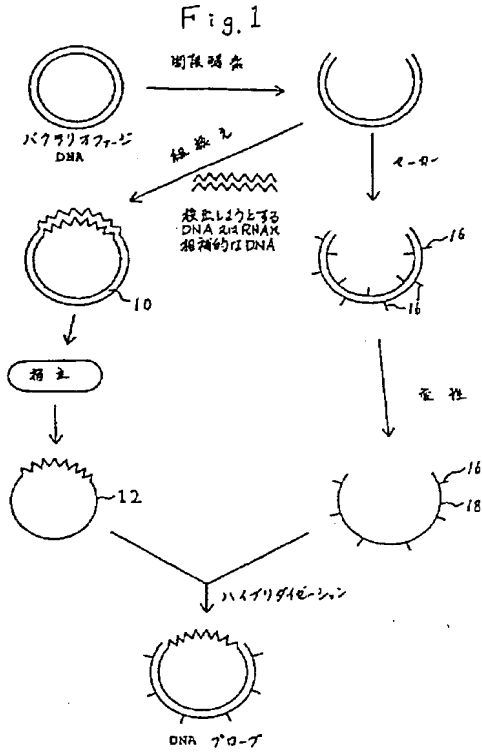
実施例1と同じ方法により、1.4 kbのBamHI断片が挿入されたHB/M13を得た。

##### 2. ビオチン標識DNAプローブの調製

###### 1) HB/M13上でのDNAの形成

5種類の15塩基の合成オリゴDNA、すなわち、HB/M13のEcoRI部位に相補的な合成オリゴDNAと、HB/M13のM13領域の等間隔の4つの領域にそれぞれ相補的な合成オリゴDNAとをそれぞれ1 µgずつ含む水溶液100 µlを、TE緩衝液(10 mM Tris-HCl及び1 mM EDTA pH8.0)中HB/M13(0.5 µg/µl)40 µlと混合し、この混合物を55°Cで5分間インキュベートした。次にMgCl<sub>2</sub>及びNaClをそれぞれ7 mM及び100 mMの終濃度になるように加えた。制限酵素EcoRI溶液(12単位/µl)3 µlを加え、この混合物を37°Cで3時間イン

pBR322中に挿入されたHBV DNAの検出及び定量の結果、10 ng/ml以上の濃度のスポットが陽性であった。



国際調査報告

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER According to International Patent Classification (IPC) as to the International Classification and IPC IPC <sup>4</sup> : C 07 H 21/04; C 12 Q 1/68; C 12 Q 1/70; // C 12 N 15/00	
II. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT*	
X, Y Chemical Abstracts, volume 87, no. 5, 2 August 1982, (Columbus, Ohio, US), M.T. Hu et al.: "The making of strand- specific H13 probes", see page 131, Abstract 34130k, & Gene 1982, 17(3), 271-7	1-12
P, Y EP, A, 0192168 (MOLECULAR DIAGNOSTICS INC.) 27 August 1986 see the whole document, especially page 12, lines 3-14	1-12
Y EP, A, 0133671 (MILES LABORATORIES INC.) 6 March 1983 See pages 24-26	1-12
Y EP, A, 0147665 (MOLECULAR DIAGNOSTICS INC.) 10 July 1985 see abstract; page 4, line 5 - page 5, line 31; page 7, line 12 - page 8, line 8; figure 1	1-12
P, A EP, A, 0172153 (SMITHKLINE BECKMAN CORP.)	
III. STATEMENTS OF THE INVENTOR	
Date of the Actual Completion of the International Search 8th April 1987	Date of Mailing of the International Search Report 18 MAY 1987
International Searching Authority EUROPEAN PATENT OFFICE	Name of Applicant M. VAN MOL

International Application No. PCT/JP 86/00662

III. DOCUMENTS REFERENCED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)	
X 19 February 1986 see abstract; page 5, line 23 - page 7, line 12 -- EP, A, 0153875 (AMERSHAM INTERNATIONAL plc) 4 September 1985 see abstract, pages 2-5; figure 1/1	1 1-12

## ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON

INTERNATIONAL APPLICATION NO. PCT/JP 86/00662 (SA 13878)

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 22/04/87

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0192160	27/08/88	AU-A- 5329485 JP-A- 61195899	28/08/88 29/08/88
EP-A- 013871	06/03/85	AU-A- 3138784 JP-A- 60100056	07/02/85 03/06/85
EP-A- 0147665	10/07/85	AU-A- 3652384 JP-A- 60144662	20/08/85 31/07/85
EP-A- 0172153	19/02/86	AU-A- 4245885 JP-A- 61001388	21/11/85 07/01/86
EP-A- 0153873	04/09/85	JP-A- 60208997	21/10/85

For more details about this annex :  
see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82